

Особенности экспрессии антигенов, участвующих в формировании иммунологического синапса, при лимфоме из клеток маргинальной зоны селезенки

Д.С. Бадмажапова, И.В. Гальцева, Е.Е. Звонков, Ю.О. Давыдова, Н.М. Капранов, Т.Н. Моисеева, А.М. Ковригина, У.Л. Джулакян, К.И. Данишян, К.Р. Сабиров, Е.Н. Паровичникова, В.Г. Савченко

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России;
Россия, 125167 Москва, Новый Зыковский проезд, 4

Контакты: Дарима Сэмункоевна Бадмажапова badmazhapova-darima@mail.ru

Введение. Лимфома из клеток маргинальной зоны селезенки (ЛМЗС) — индолентная неходжкинская В-клеточная лимфома, представленная морфологически зрелыми В-клетками, которые формируют маргинальную зону фолликулов белой пульпы селезенки. Опухолевые В-клетки ЛМЗС не имеют специфичных иммунофенотипических маркеров и, как правило, данный диагноз требует исключения других неходжкинских В-клеточных лимфом. Несмотря на индолентное течение ЛМЗС, встречаются рефрактерные формы и прогрессирующее течение заболевания, при этом отмечается ежегодный рост заболеваемости ЛМЗС. Механизмы уклонения опухолевых клеток от иммунологического контроля разнообразны. Обнаружено, что для В-лимфопротиперативных заболеваний характерна экспрессия антигенов гистосовместимости HLA I/II класса и костимуляторных молекул CD80 и CD86. Таким образом, опухолевые В-лимфоциты могут выступать в качестве антигенпрезентирующих клеток для Т-лимфоцитов.

Т-клеточный иммунный ответ играет важную роль в противоопухолевом контроле. Известно, что для адекватной активации Т-лимфоцитов требуется формирование иммунологического синапса и наличие 2 активационных сигналов (распознавание антигена и костимуляция CD28-CD80/86). Согласно современной концепции развития опухолевых заболеваний происходит постепенная селекция опухолевых клонов, в результате чего остаются лишь «невидимые» для иммунной системы опухолевые клетки. Механизмы уклонения опухолевых В-клеток ЛМЗС от иммунного надзора в настоящее время до конца не изучены.

Цель исследования — изучить особенности экспрессии антигенов, входящих в состав иммунологического синапса, у больных ЛМЗС в периферической крови.

Материалы и методы. В исследование включены 10 пациентов с впервые установленным диагнозом ЛМЗС. У всех пациентов определена IV стадия заболевания по классификации Ann Arbor. На 1-м этапе лечения всем пациентам была выполнена спленэктомия. У 2 пациентов выявлено прогрессирование ЛМЗС после спленэктомии, что потребовало проведения химиотерапии. В контрольную группу вошли 25 здоровых доноров. В качестве материала для анализа использовали периферическую кровь. Исследование проводили однократно в дебюте заболевания на 6-цветном проточном цитофлуориметре BD FACSCanto II (BD Biosciences, США).

Результаты. Опухолевые В-клетки ЛМЗС отличаются от В-клеток здоровых доноров большей долей клеток CD80⁺, FAS⁺, PD-1⁺, что указывает на активированное состояние В-клеток при ЛМЗС. Доля Т-клеток CD4⁺PD-1⁺ и CD8⁺PD-1⁺ у пациентов с ЛМЗС была выше по сравнению с таковой в контрольной группе. У пациентов с ЛМЗС с наличием прогрессии после спленэктомии отмечалась большая доля Т-клеток, экспрессирующих PD-1, по сравнению с пациентами с индолентным течением ЛМЗС.

Заключение. Таким образом, наиболее значимым механизмом уклонения от иммунного надзора при ЛМЗС является подавление функции Т-лимфоцитов через взаимодействие PD-1—PD-L1. Наиболее выраженное угнетение Т-клеточного звена иммунитета вызывает неконтролируемое течение опухолевого процесса.

Ключевые слова: лимфома из клеток маргинальной зоны селезенки, иммунологический синапс, иммунный ответ при лимфомах

Для цитирования: Бадмажапова Д.С., Гальцева И.В., Звонков Е.Е. и др. Особенности экспрессии антигенов, участвующих в формировании иммунологического синапса, при лимфоме из клеток маргинальной зоны селезенки. Онкогематология 2020;15(4):18–28.

DOI: 10.17650/1818-8346-2020-15-4-18-28



Expression features of antigens involved in the formation of immunological synapse in splenic marginal zone lymphoma

D.S. Badmazhapova, I.V. Galtseva, E.E. Zvonkov, Yu.O. Davydova, N.M. Kapranov, T.N. Moiseeva, A.M. Kovrigina, U.L. Julhakyan, K.I. Danishyan, K.R. Sabirov, E.N. Parovichnikova, V.G. Savchenko

National Medical Research Center for Hematology, Ministry of Health of Russia; 4 Novyy Zykovskiy Proezd, Moscow 125167, Russia

Background. Splenic marginal zone lymphoma (SMZL) is an indolent non-Hodgkin's B-cell lymphoma. It presents morphologically by mature lymphoid B-cells. They conform to these immunological characteristics of marginal zone lymphocytes from secondary follicles. The tumor B-cells of SMZL do not have specific markers of immunophenotype and requires the exclusion of other non-Hodgkin's B-cell lymphomas. There is an annual increase in the incidence of SMZL. There are refractory forms and progressive course of the SMZL.

There is a huge variety of the mechanisms of evading tumor cells from immunological control. Unlike solid tumors, B-lymphoproliferative diseases are characterized by the expression of HLA I/II and co-stimulatory molecules (CD80 and CD86). Therefore, tumor B-lymphocytes can act as antigen-presenting cells (APC) for T lymphocytes.

The T-cell immune response is known to play an important role in antitumor control. It is known that effective activation of T-lymphocytes requires the formation of an immunological synapse and the presence of two activation signals (antigen recognition and co-stimulation of CD28-CD80/86). According to the modern concept of tumor development, there is a gradual selection of tumor clones. As a result, only tumor cells that are invisible to the immune system remain. Mechanisms of evasion of tumor B-cells of SMZL from immune surveillance are currently not fully understood and are being actively studied.

Objective: to study the expression features of antigens involved in the formation of immunological synapse in patients with SMZL in peripheral blood.

Materials and methods. The study includes 10 primary SMZL patients; all patients have stage IV according to the Ann Arbor classification. Splenectomy was performed for all patients as a first stage of treatment. Two patients had progression of SMZL after splenectomy, which required chemotherapy. The control group included 25 healthy donors. Peripheral blood was used as a material for analysis. The study was conducted on a 6-color BD FACS Canto II flow cytometer (BD Biosciences, USA) immediately after diagnosis.

Results. Tumor B-cells of SMZL are different from B-cells of healthy donors with a greater proportion of CD80⁺, FAS⁺, PD-1⁺-cells, which may correspond to activated B-cells. The proportion of CD4⁺PD-1⁺ and CD8⁺PD-1⁺ T-cells in patients with SMZL was higher in comparison with the control group. There was a large proportion of T-cells expressing PD-1 in the group of patients with SMZL progression after splenectomy in comparison with the group of patients with indolent course of SMZL.

Conclusion. Thereby, tumor B-cells of the SMZL retains the features of non-tumor analogues. The most significant mechanism for evading immune surveillance in an SMZL is inhibition of the T-cell immunity via the PD-1–PD-L1 pathway. The most pronounced inhibition of T-cell immunity causes an uncontrolled tumor process.

Key words: splenic marginal zone lymphoma, immunological synapse, immune response in lymphomas

For citation: Badmazhapova D.S., Galtseva I.V., Zvonkov E.E. et al. Expression features of antigens involved in the formation of immunological synapse in splenic marginal zone lymphoma. *Onkogematologiya* = *Oncohematology* 2020;15(4):18–28. (In Russ.).

Введение

Лимфома из клеток маргинальной зоны селезенки (ЛМЗС) – индолентная неходжкинская В-клеточная лимфома, представленная морфологически зрелыми В-клетками, которые формируют маргинальную зону фолликулов белой пульпы селезенки [1]. Среди всех В-лимфопрлиферативных заболеваний доля ЛМЗС составляет 0,9–1 % [1–4]. ЛМЗС клинически характеризуется спленомегалией, нередко выраженными симптомами интоксикации, умеренным лейкоцитозом за счет лимфоцитоза, часто увеличением лимфатических узлов в области ворот селезенки, поражением костного мозга, лейкокемизацией и в части случаев протекает с секрецией моноклонального иммуноглобулина, который обнаруживается в сыворотке крови и/или моче.

Согласно современной концепции развития опухолевых заболеваний происходит постепенная селекция опухолевых клонов, в результате чего остаются лишь «невидимые» для иммунной системы опухолевые клетки [5–8]. Поэтому приобретение клетками опухолевого фенотипа является многоступенчатым процессом, в ходе которого эти клетки получают уникальные биологические свойства [8–10]. Механизмы уклонения опухолевых клеток от иммунного надзора разнообразны. Для В-лимфопрлиферативных заболеваний характерна экспрессия антигенов гистосовместимости HLA I/II класса и костимуляторных молекул CD80 и CD86. Таким образом, опухолевые В-лимфоциты могут выступать в качестве антигенпрезентирующих клеток для Т-лимфоцитов [11, 12].

Немаловажная роль в противоопухолевом иммунном ответе отводится Т-лимфоцитам, в частности регулированию экспрессии молекул, участвующих в формировании иммунологического синапса [13]. В основе патогенеза заболевания лежат нарушение апоптоза опухолевых клеток, а также их способность вызывать анергию Т-лимфоцитов и тем самым избегать иммунного надзора. В норме пути ингибирования Т-лимфоцитов необходимы для подавления иммунного ответа после элиминации антигена из организма и/или предотвращения аутоиммунных реакций [14, 15]. Отсутствие второго костимуляторного сигнала вызывает анергию Т-лимфоцитов [7–10, 14, 15]. Снижение экспрессии на опухолевых В-клетках молекулы FAS предотвращает внешний, FAS-опосредованный, путь апоптоза [16, 17]. Также важную роль в развитии анергии иммунной системы играют ингибирующие пути регуляции клеток, в частности путь PD-1/PD-L1.

PD-1 (CD279) – рецептор, относящийся к иммунным контрольным точкам, негативно регулирует функцию клеток, в частности Т-лимфоцитов, и его экспрессия на Т-клетках наблюдается спустя некоторое время после их активации [18, 19]. В силу взаимодействия с лигандами PD-L1 (CD274) и PD-L2 (CD273) PD-1 подавляет пролиферацию, продукцию цитокинов и цитотоксические возможности Т-клеток, поддерживая процесс периферической толерантности [16]. PD-L1 может экспрессироваться как на гемопоэтических, так и на негемопоэтических клетках [20, 21], что играет важную роль в механизмах толерантности. В дополнение к этому PD-L1 часто экспрессируется на опухолевых

клетках как один из механизмов уклонения от иммунного надзора [22–24].

Повышение экспрессии PD-1 на поверхности Т-лимфоцитов является признаком «истощенного» иммунотипа, что указывает на сниженную функциональную активность Т-клеток [25, 26]. «Истощенный» иммунотип цитотоксических Т-лимфоцитов был описан при хронической вирусной инфекции. При этом Т-лимфоциты экспрессировали PD-1, после чего наблюдалась прогрессирующая потеря функции цитотоксичности и продукции цитокинов [27]. Также было обнаружено, что при опухолевых заболеваниях опухольинфильтрирующие Т-лимфоциты экспрессируют PD-1, что указывает на их «истощенный» иммунотип. При изучении Т-клеточного звена иммунитета у пациентов с лимфомами было выявлено, что Т-лимфоциты экспрессировали на мембране PD-1 с большей плотностью, что также свидетельствовало об «истощении» функции Т-клеток при лимфомах [25, 26]. В настоящее время определено, что опухолевое микроокружение также может влиять на «истощение» функции Т-клеток [25–30].

Таким образом, существует достаточно большое количество данных о механизмах уклонения опухолевых лимфоцитов при В-клеточных лимфомах от иммунного надзора и подавления Т-клеточного звена иммунитета. Однако данных об особенностях опухолевых В-клеток при ЛМЗС и Т-клеточного иммунитета при этом заболевании немного.

Цель исследования — изучение экспрессии антигенов, входящих в состав иммунологического синапса (FAS, CD80, CD86, PD-1 и PD-L1) на опухолевых клетках ЛМЗС, а также экспрессии PD-1 и PD-L1 на поверхности CD4⁺- и CD8⁺-Т-клеток.

Материалы и методы

В исследование были включены 10 пациентов (7 женщин и 3 мужчин) с впервые установленным диагнозом ЛМЗС. Медиана возраста составила 60 (49–70) лет. У всех пациентов определена IV стадия заболевания по классификации Ann Arbor (поражение костного мозга и лейкомизация). У всех пациентов отмечалась спленомегалия (18–31 см). На 1-м этапе в качестве 1-й линии терапии была выполнена спленэктомия. Прогрессирование ЛМЗС после спленэктомии зарегистрировано у 2 (20 %) пациентов, что потребовало проведения химиотерапии.

Характеристика пациентов, включенных в исследование, до и после спленэктомии представлена в табл. 1.

Контрольную группу составили 25 здоровых доноров (13 женщин и 12 мужчин). Медиана возраста доноров составила 48 (40–64) лет.

Исследование проведено с сентября 2015 г. по январь 2018 г. В качестве материала для анализа использовали периферическую кровь с антикоагулянтom ЭДТА. Исследование выполнено однократно в дебюте

Таблица 1. Характеристика пациентов с лимфомой из клеток маргинальной зоны селезенки

Table 1. Characteristics of patients with splenic marginal zone lymphoma

Характеристика Characteristic	До спленэктомии Before splenectomy	После спленэктомии After splenectomy
Число пациентов, <i>n</i> Number of patients, <i>n</i>	10	10
Медиана возраста (диапазон), лет Median age (range), years	61 (47–74)	61 (47–74)
IV стадия по классификации Ann Arbor, <i>n</i> (%) IV stage according to Ann Arbor classification, <i>n</i> (%)	10 (100)	—
Уровень лактатдегидрогеназы повышен (>378 Е/л), <i>n</i> (%) Lactate dehydrogenase level (>378 U/L), <i>n</i> (%)	10 (100)	5 (50)
Размер селезенки, <i>n</i> (%): Spleen size, <i>n</i> (%):		
умеренный (12–15 см) moderate (12–15 cm)	0	
выраженный (15–20 см) pronounced (15–20 cm)	2 (20)	
значительный (20–25 см) significant (20–25 cm)	6 (60)	—
массивный (26–30 см) massive (26–30 cm)	0	
гигантский (>30 см) giant (>30 cm)	2 (60)	
Анемия (уровень гемоглобина <110 г/л), <i>n</i> (%) Anemia (hemoglobin level <110 g/L), <i>n</i> (%)	6 (60)	2 (20)
Тромбоцитопения (уровень тромбоцитов <180 × 10 ⁹ /л), <i>n</i> (%) Thrombocytopenia (platelet count <180 × 10 ⁹ /L), <i>n</i> (%)	9 (90)	2 (20)
Лейкоцитоз (уровень лейкоцитов >9 × 10 ⁹ /л), <i>n</i> (%) Leukocytosis (leukocyte count >9 × 10 ⁹ /L), <i>n</i> (%)	4 (40)	5 (5)
Лимфоцитоз (уровень лимфоцитов >25 %), <i>n</i> (%) Lymphocytosis (lymphocyte count >25 %), <i>n</i> (%)	10 (100)	9 (90)
Прогрессирование, <i>n</i> (%) Progression, <i>n</i> (%)	10 (100)	2 (20)

заболевания на 6-цветном проточном цитофлуориметре BD FACSCanto II (BD Biosciences, США).

Сначала проводили лизис эритроцитов раствором, содержащим хлорид аммония, PharmLyse (BD Biosciences, США), затем клетки осаждали центрифугированием и отмывали в растворе CellWash (BD Biosciences, США). Использовали моноклональные антитела

против CD19 PE (SJ25C1), CD5 PerCP-Cy5.5 (L17F12), CD4 APC-Cy7 (SK3), CD8 PerCP (SK1), CD3 APC (SK7), CD279 (PD-1) FITC (M1H4), CD274 (PD-L1) PE-Cy7 (M1H1), CD80 FITC (L307.4), CD86 APC (2331), CD95 (FAS) PE-Cy7 (DX2), CD45 APC-Cy7 (2D1) производства BD Biosciences (США).

Подробная схема гейтирования В-клеток представлена на рис. 1. На 1-м этапе проводили выделение клеток по параметру прямого светорассеяния (FSC-A против FSC-H), отбирали одиночные клетки, «дубли» из исследования исключали. Далее исключали «дебрис» (FSC-A против SSC-A). По экспрессии антигена CD45 выделяли только лейкоциты (CD45⁺-клетки). Далее отбирали CD19⁺CD5⁻-В-клетки. Клональность В-клеток подтверждалась рестрикцией по легким цепям иммуноглобулинов (см. рис. 1).

После выделения опухолевого гейта определяли долю опухолевых В-клеток, экспрессирующих FAS, CD80, CD86, PD-1, PD-L1. На рис. 2 представлены при-

меры популяций клеток, положительных по маркерам FAS, CD80, CD86, PD-1, PD-L1. Для выделения субпопуляции, экспрессирующей определенный антиген, использовали метод контроля «флуорохром минус один» (ФМО).

Подробная схема гейтирования Т-клеток представлена на рис. 3. На 1-м этапе проводили выделение клеток по параметру прямого светорассеяния (FSC-A против FSC-H), отбирали одиночные клетки, «дубли» и «дебрис» (FSC-A против SSC-A) из исследования исключали. По маркеру CD3 выделяли только Т-лимфоциты и проводили обратное гейтирование. Далее разделяли Т-лимфоциты по экспрессии CD8 (цитотоксические Т-клетки) и CD4 (Т-хелперы).

Подсчитывали долю клеток CD4⁺ и CD8⁺, экспрессирующих молекулы PD-1. На рис. 4 представлен пример положительной экспрессии PD-1 на CD4⁺- и CD8⁺-Т-клетках, а также пример отрицательного контроля ФМО.

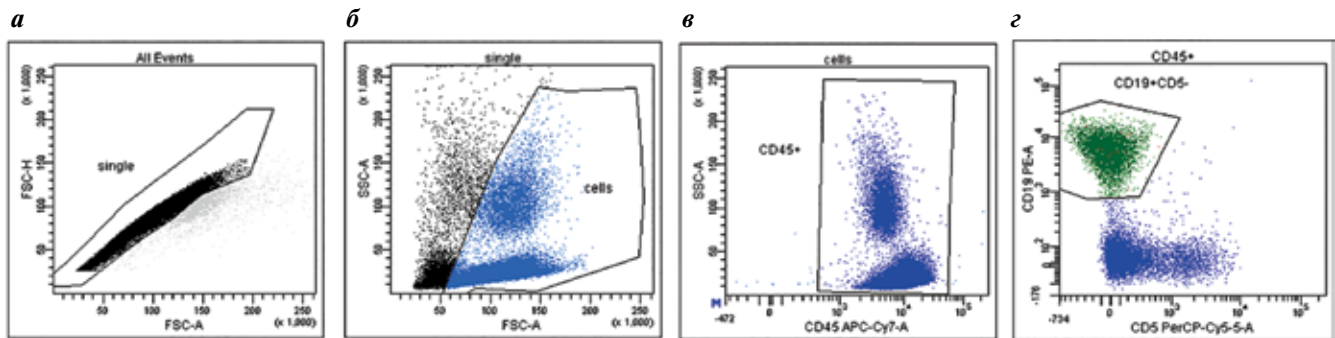


Рис. 1. Выделение и анализ В-клеток методом проточной цитофлуориметрии: а – выделение только одиночных клеток; б – исключение из анализа «дебриса»; в – выделение CD45⁺-клеток; г – выделение популяции CD19⁺CD5⁻-клеток
Fig. 1. Selection and analysis of B-cells by flow cytometry: а – selection of single cells only; б – exclusion of debris from analysis; в – CD45⁺-cells selection; г – CD19⁺CD5⁻-cells selection

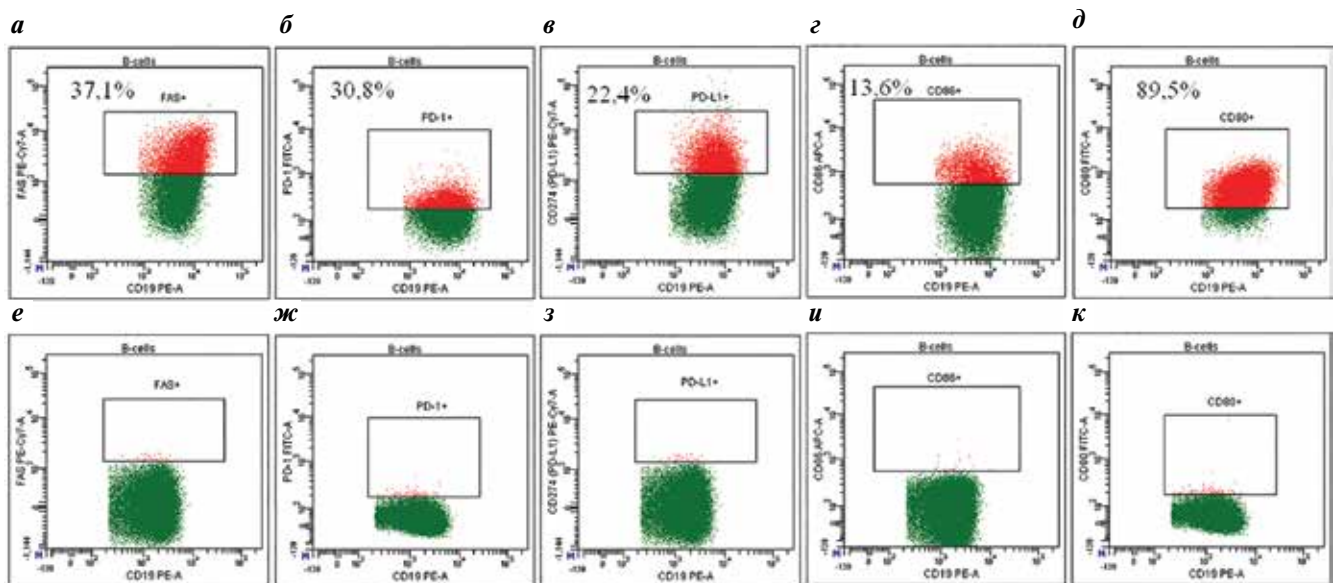


Рис. 2. Примеры точечных диаграмм, применяемых для определения на опухолевых В-клетках лимфомы из клеток маргинальной зоны селезенки доли FAS (а), PD-1 (б), PD-L1 (в), CD86 (г), CD80 (д); контроль «флуорохром минус один» (ФМО) для FAS (е), PD-1 (ж), PD-L1 (з), CD86 (и), CD80 (к)
Fig. 2. Scatter charts examples of FAS (а), PD-1 (б), PD-L1 (в), CD86 (г), CD80 (д) proportion on tumor B-cells of splenic marginal zone lymphoma; control “fluorescence minus one” (FMO) for FAS (е), PD-1 (ж), PD-L1 (з), CD86 (и), CD80 (к)

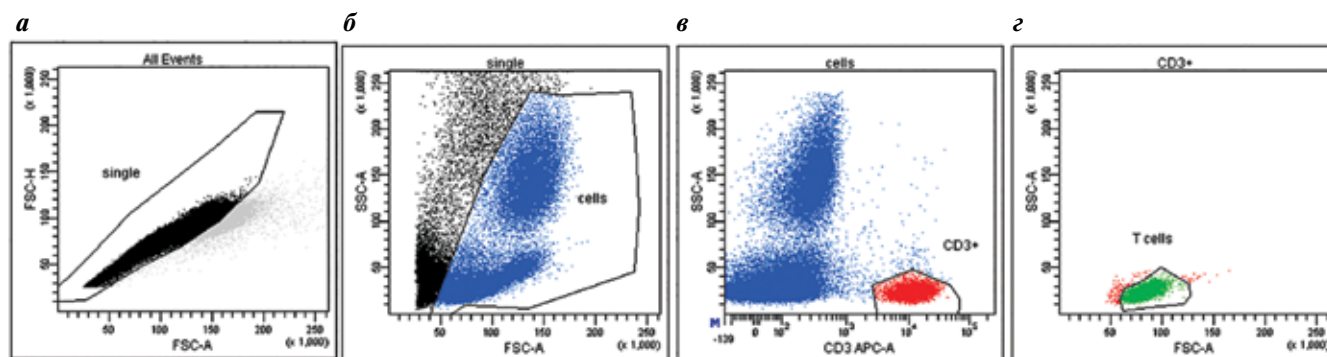


Рис. 3. Схема анализа Т-клеток методом проточной цитофлуориметрии: а – выделение только одиночных клеток; б – исключение из анализа «дебриса»; в – выделение только Т-клеток; г – проведение обратного гейтирования популяции Т-клеток

Fig. 3. Flow cytometry analysis of T-cells: a – selection of single cells only; б – exclusion of debris from analysis; в – selection T-cells only; г – reverse gating of the T-cell population

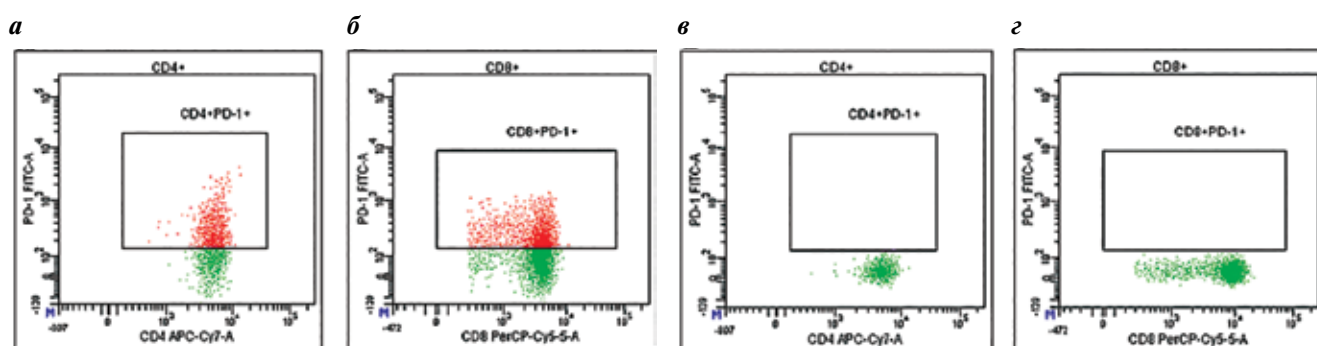


Рис. 4. Примеры точечных диаграмм, используемых для определения экспрессии PD-1 на Т-хелперах и цитотоксических Т-клетках: а – пример положительной экспрессии для CD4⁺-клеток; б – пример положительной экспрессии для CD8⁺-клеток; в – контроль «флуорохром минус один» (ФМО) для CD4⁺-клеток; г – ФМО-контроль для CD8⁺-клеток

Fig. 4. Scatter charts examples of PD-1 expression on helper T-cells and cytotoxic T-cells: а – an example of positive expression for CD4⁺-cells; б – an example of positive expression for CD8⁺-cells; в – control “fluorochrome minus one” (FMO) for CD4⁺-cells; г – FMO control for CD8⁺-cells

Результаты иммунофенотипирования оценивали с помощью программного обеспечения FACSDiva 8.2 (BD Biosciences, США).

Статистический анализ проводили с помощью GraphPad Prism 6.01. Данные представлены в виде медианы (95 % доверительный интервал для медианы) выборки. Нормальность распределения данных проверяли с использованием критерия Шапиро–Уилка (при $p < 0,05$ распределение ненормальное). Проверку достоверности различий средних выборок с нормальным распределением осуществляли с помощью критерия Стьюдента. Для проверки достоверности различий выборок, подчиняющихся ненормальному распределению, использовали критерий Манна–Уитни. Достоверными считали различия при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

Нами был проведен сравнительный анализ доли В-клеток, экспрессирующих FAS, CD80, CD86, PD-1 и PD-L1, среди всех В-лимфоцитов и доли Т-клеток, экспрессирующих PD-1 и PD-L1, среди всех Т-лимфоцитов у пациентов с ЛМЗС и доноров (табл. 2).

Доля В-клеток с коэкспрессией CD80, FAS и PD-1 была больше у пациентов с ЛМЗС, чем у доноров

($p = 0,001$; $p = 0,0021$; $p = 0,0387$ соответственно) (рис. 5а, в, г). Коэкспрессия CD80 на опухолевых В-клетках ЛМЗС позволяет им выступать в качестве антигенпрезентирующих клеток для Т-лимфоцитов.

Доля опухолевых В-клеток CD86⁺, PD-L1⁺ достоверно не отличалась от доли В-клеток CD86⁺, PD-L1⁺ у доноров (рис. 5б, д). Однако отмечено, что доля опухолевых В-клеток ЛМЗС с коэкспрессией PD-L1 больше, чем у доноров ($p = 0,06$) (рис. 5д). Отсутствие достоверных различий, возможно, обусловлено малочисленностью группы пациентов.

Среди Т-хелперов и цитотоксических Т-клеток доля клеток с коэкспрессией PD-1 была больше у пациентов с ЛМЗС, чем у доноров ($p < 0,0001$ и $p = 0,0204$ соответственно) (рис. 6). Это может свидетельствовать об активном взаимодействии Т-лимфоцитов с В-клетками ЛМЗС, в результате чего функция Т-клеток «истощается».

Доля цитотоксических Т-клеток с коэкспрессией PD-L1 была меньше у пациентов с ЛМЗС, чем у доноров ($p = 0,0229$).

С учетом того что у 2 больных зарегистрировано прогрессирование заболевания после спленэктомии, было выполнено сравнение доли В-клеток, экспрессирующих FAS, CD80, CD86, PD-1, PD-L1, и Т-клеток,

Таблица 2. Значения количества опухолевых клеток у пациентов с ЛМЗС и В-клеток у доноров с коэкспрессией FAS, CD80, CD86, PD-1, PD-L1 и количество Т-клеток с коэкспрессией PD-1, PD-L1 у пациентов с ЛМЗС и доноров

Table 2. The number of tumor cells in SMZL patients and B-cells in donors with co-expression of FAS, CD80, CD86, PD-1, PD-L1 and the number of T-cells with PD-1, PD-L1 co-expression in SMZL patients and donors

Популяция клеток Cell population	Антиген Antigen	Пациенты с ЛМЗС, % SMZL patients, %	Доноры, % Donors, %	p
В-клетки (CD19 ⁺ CD5 ⁻) B-cells (CD19 ⁺ CD5 ⁻)	CD80 ⁺	29,0 ± 9,6	11,3 ± 19,9	0,001
	CD86 ⁺	2,0 ± 2,3	4,8 ± 2,1	0,1427
	FAS ⁺	56,7 ± 11,3	14,8 ± 1,8	0,0387
	PD-1 ⁺	16,9 ± 6,0	1,5 ± 0,3	0,0021
	PD-L1 ⁺	57,7 ± 11,1	9,1 ± 3,8	0,0699
Т-клетки (CD3 ⁺) T-cells (CD3 ⁺)	CD4 ⁺ PD-1 ⁺	20,8 ± 4,3	3,7 ± 1,0	<0,0001
	CD8 ⁺ PD-1 ⁺	10,2 ± 4,6	5,7 ± 1,2	0,0204
	CD4 ⁺ PD-L1 ⁺	0,8 ± 2,3	1,0 ± 0,1	0,3462
	CD8 ⁺ PD-L1 ⁺	0,4 ± 0,5	0,9 ± 0,1	0,0229

Примечание. Жирным шрифтом указано наличие статистически значимых различий. ЛМЗС — лимфома из клеток маргинальной зоны селезенки.

Note. The presence of statistically significant differences is indicated in bold. SMZL — splenic marginal zone lymphoma.

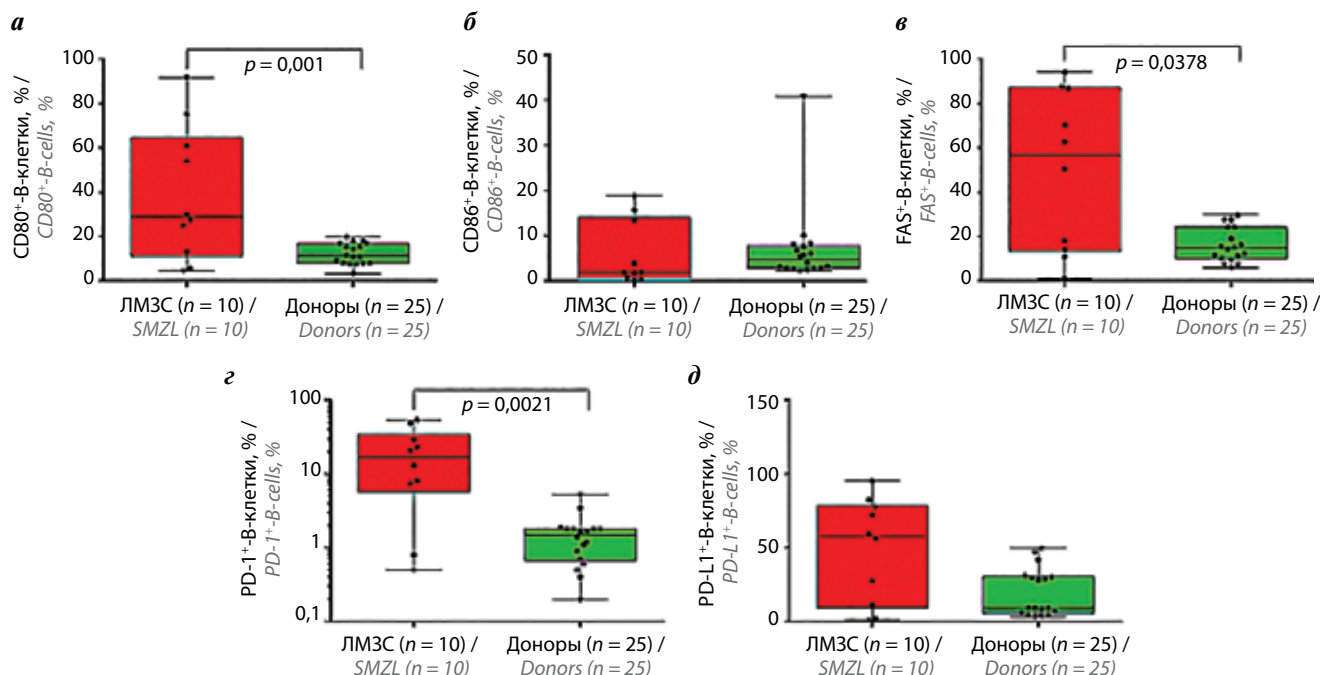


Рис. 5. Относительное количество В-клеток, экспрессирующих антигены, участвующие в формировании иммунологического синапса, в группе пациентов с лимфомой из клеток маргинальной зоны селезенки (ЛМЗС) и контрольной группе: а — CD80; б — CD86; в — FAS; г — PD-1; д — PD-L1
Fig. 5. The relative number of B-cells expressing antigens involved in the immunological synapse formation in the group of patients with splenic marginal zone lymphoma (SMZL) and the control group: a — CD80; б — CD86; в — FAS; г — PD-1; д — PD-L1

экспрессирующих PD-1 и PD-L1, у пациентов с индолентным течением и прогрессированием заболевания. Достоверных различий не получено, что, вероятно, обусловлено малым числом больных. Однако отмечено, что пациенты с прогрессированием заболевания имели большую долю Т-клеток с экспрессией PD-1, что указывает на более глубокое ингибирование

Т-клеточного звена, в отличие от индолентного течения заболевания (рис. 7).

Обсуждение

Результаты выполненного нами исследования демонстрируют, что опухолевые В-клетки имеют свои особенности и отличаются от В-клеток доноров (рис. 8).

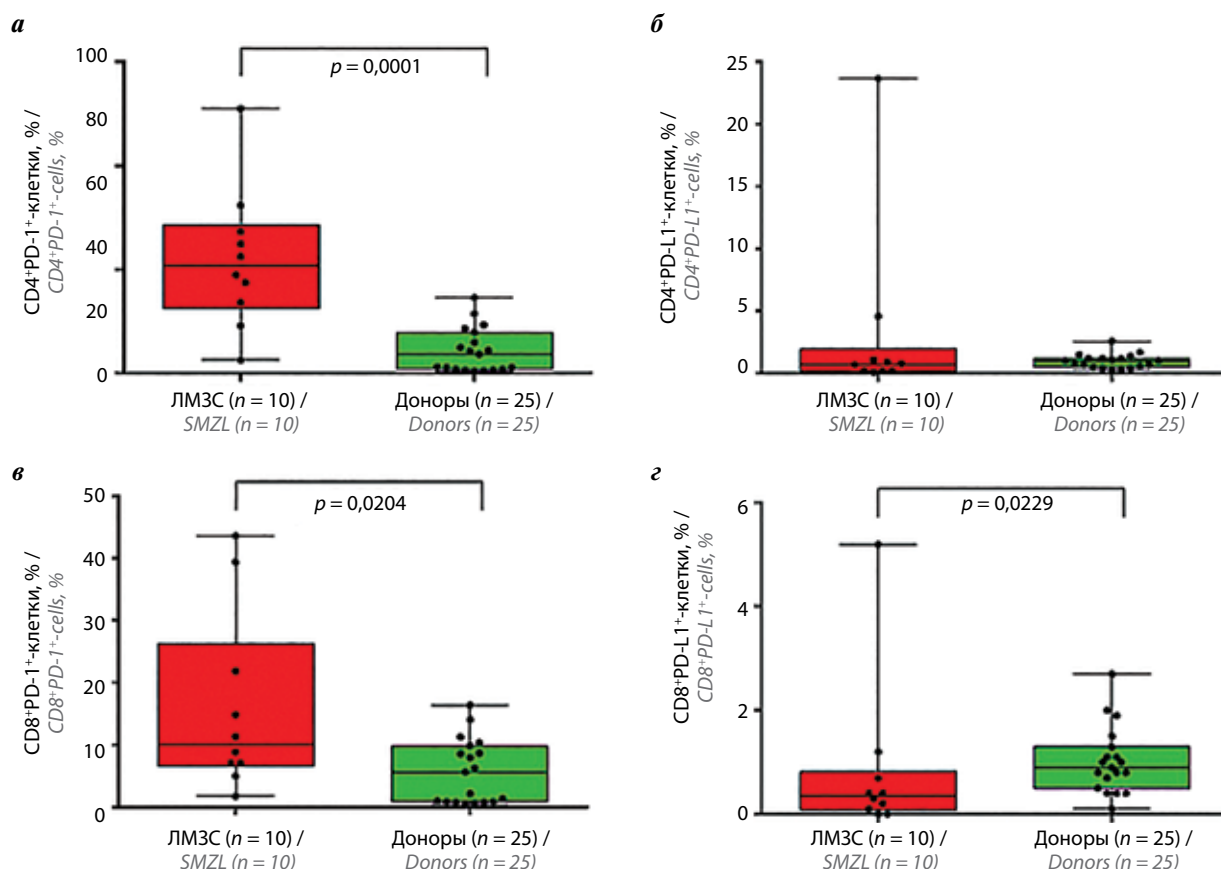


Рис. 6. Относительное количество Т-клеток, экспрессирующих PD-1 и PD-L1, в группе пациентов с лимфомой из клеток маргинальной зоны селезенки (ЛМЗС) и контрольной группе: а – CD4⁺PD-1⁺; б – CD4⁺PD-L1⁺; в – CD8⁺PD-1⁺; г – CD8⁺PD-L1⁺

Fig. 6. The relative number of T-cells expressing PD-1 and PD-L1 in the group of patients with splenic marginal zone lymphoma (SMZL) and the control group: а – CD4⁺PD-1⁺; б – CD4⁺PD-L1⁺; в – CD8⁺PD-1⁺; г – CD8⁺PD-L1⁺

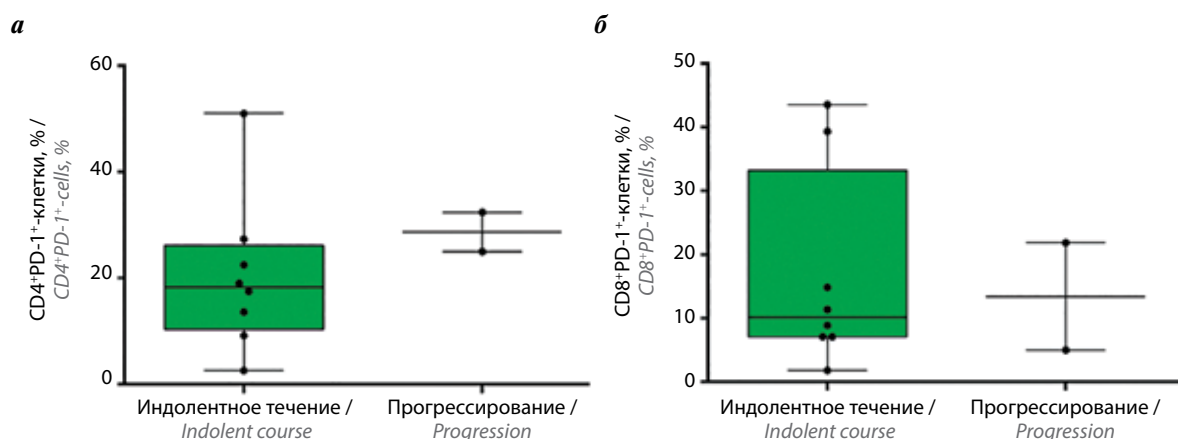


Рис. 7. Относительное количество Т-клеток, экспрессирующих PD-1, в группе пациентов с лимфомой из клеток маргинальной зоны селезенки с индолентным и прогрессирующим течением заболевания: а – CD4⁺PD-1⁺; б – CD8⁺PD-1⁺

Fig. 7. The relative number of T-cells expressing PD-1 in the group of patients with splenic marginal zone lymphoma with indolent course and progression: а – CD4⁺PD-1⁺; б – CD8⁺PD-1⁺

Так, относительное количество опухолевых В-клеток ЛМЗС, экспрессирующих антигены PD-1, CD80 и FAS, больше по сравнению с В-клетками доноров контрольной группы. Также отмечено, что доля В-клеток ЛМЗС с коэкспрессией PD-L1 была больше, чем у доноров ($p = 0,06$). Известно, что ЛМЗС происходит из В-клеток маргинальной зоны селезенки, что опре-

деляет их клинические и биологические особенности [1, 14, 15]. В-лимфоциты маргинальной зоны селезенки способны быстро и эффективно отвечать на патогены и обеспечивают первую линию защиты [31]. Иммунофенотип В-лимфоцитов маргинальной зоны отличается от других В-клеток высокой экспрессией антигена CD21, который обеспечивает взаимодействие

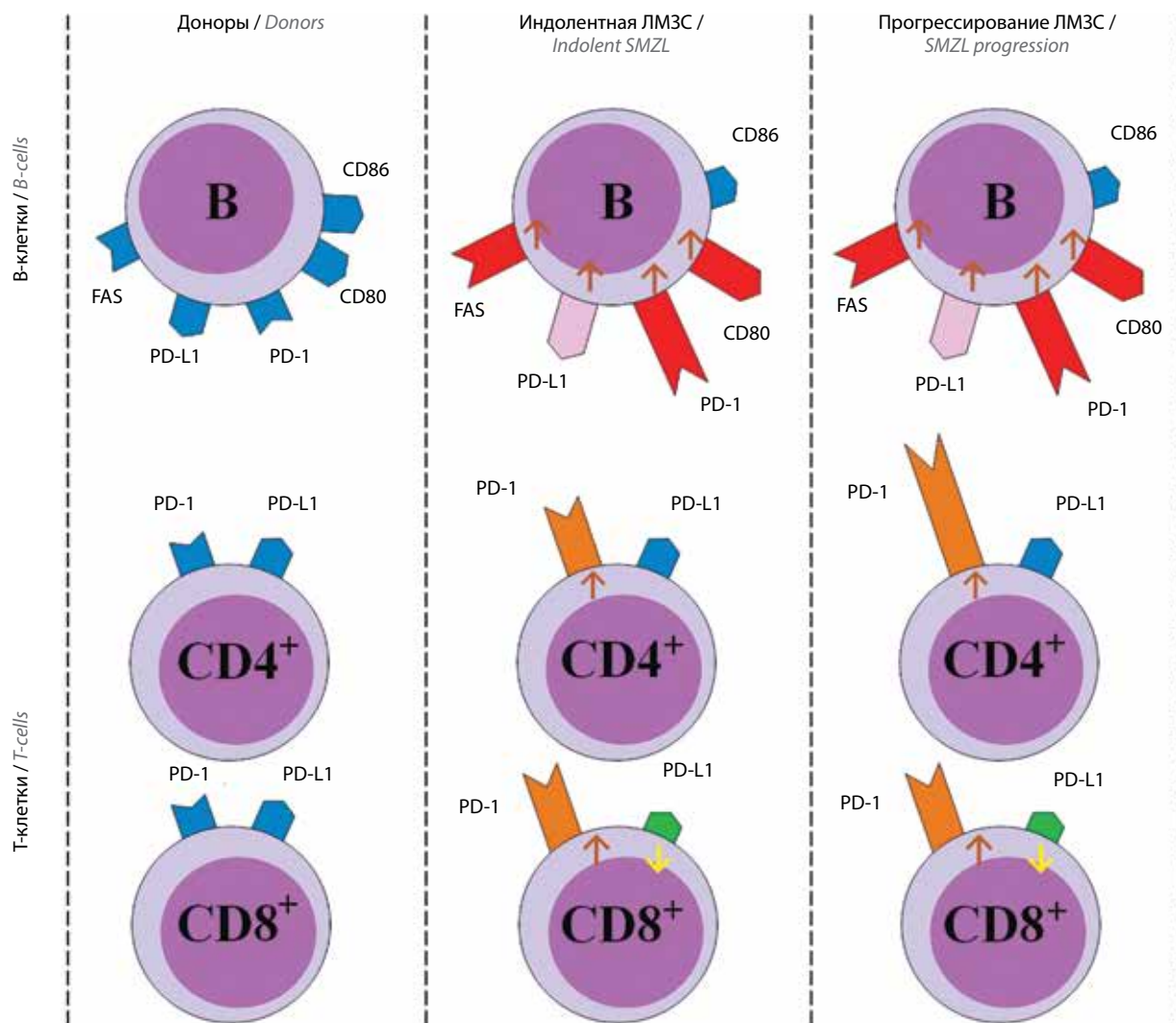


Рис. 8. Схематичное изображение экспрессии антигенов FAS, CD80, CD86, PD-1, PD-L1 на лимфоцитах у доноров и пациентов с лимфомой из клеток маргинальной зоны селезенки (ЛМЗС)

Fig. 8. Schematic representation of FAS, CD80, CD86, PD-1, PD-L1 expression on lymphocytes in donors and patients with splenic marginal zone lymphoma (SMZL)

В-клеточного рецептора с антигеном CD19 и участвует в формировании В-клеточного корецепторного комплекса, который создает значительное усиление иммунного ответа на распознаваемый антиген [32, 33]. Как и В1-лимфоциты, В-клетки маргинальной зоны экспрессируют на поверхности мембраны антиген CD9 (тетраспанин), который участвует в клеточной миграции и адгезии, и способны распознавать липополисахарид, что способствует быстрому преобразованию их в плазматические клетки [34]. В-лимфоциты маргинальной зоны с большей плотностью на мембране экспрессируют CD80 и CD86, что указывает на их активированное состояние [35]. Маркеры CD80, PD-L1, PD-L2 функционально связаны с В-клетками памяти. При наличии этих маркеров В-клетки памяти способны быстро дифференцироваться в плазмобласты при повторной стимуляции [36]. В маргинальной зоне селезенки сосредоточены В-клетки памяти [1], кото-

рые имеют большую плотность экспрессии коstimуляторных молекул (CD80 и CD86) и PD-L1/PD-L2 [11]. В недавней работе С. Vincent-Fabert и соавт. продемонстрировано, что, как и В-клетки памяти, В-клетки ЛМЗС способны экспрессировать PD-L1 [37]. Это также может указывать на то, что опухолевые клетки способны сохранять признаки и некоторые функции неопухолевых аналогов.

Таким образом, можно предположить, что наличие коstimуляторных молекул CD80 и CD86 позволяет опухолевым В-клеткам ЛМЗС активно взаимодействовать с Т-лимфоцитами, а экспрессия PD-L1 на опухолевых клетках и PD-1 на Т-клетках вызывает ингибирование функции Т-клеток.

Также опухолевые клетки ЛМЗС имеют большую плотность экспрессии PD-1 и FAS по сравнению с В-клетками контрольной группы, что указывает на функциональную активность клеток ЛМЗС.

Известно, что на В-лимфоцитах селезенки обнаружена высокая экспрессия белка API1 (ингибитор апоптоза 1), который блокирует апоптоз как по внешнему, так и по внутреннему пути. Для лимфомы из клеток маргинальной зоны характерен дефект апоптоза за счет гиперэкспрессии белка API2 (ингибитор апоптоза 2), ингибирующего активированные каспазы [38, 39]. Поэтому, несмотря на экспрессию CD95, В-клетки ЛМЗС не подвергаются FAS-опосредованному апоптозу.

Как и в случае эпителиальных опухолей, ингибирование функции Т-клеток через межклеточное взаимодействие PD-1–PD-L1 имеет большое значение, и применение анти-PD-1- или анти-PD-L1-препаратов является потенциально важным следующим шагом в терапии ЛМЗС [31]. В настоящее время уже начаты клинические исследования по применению иммунотерапии при ЛМЗС (NCT02950220, NCT02332980).

Заключение

Таким образом, было подтверждено, что опухолевые В-клетки ЛМЗС имеют отличительные особенности, проявляющиеся в виде большего количества В-клеток с коэкспрессией FAS, CD80, PD-1 и PD-L1, по сравнению с В-клетками доноров. Данные особенности в экспрессии антигенов иммунологического синапса указывают на активированное состояние В-клеток ЛМЗС и позволяют им вступать в «иммунологический диалог» с Т-клетками и использовать взаимодействие PD-1–PD-L1 для уклонения от иммунного ответа. При прогрессировании ЛМЗС отмечена большая доля Т-клеток с экспрессией PD-1 по сравнению с Т-клетками пациентов с индолентным течением заболевания. Полученные данные показывают, что Т-клеточный иммунный ответ является одним из главных механизмов контроля над опухолевыми клетками ЛМЗС.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Swerdlow S.H., Campo E., Harris N.L. et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, 2017. Pp. 291–297.
2. Джулакян У.Л., Гриншпун Л.Д. Селезеночная лимфома из клеток маргинальной зоны (лимфоцитомы селезенки) у пожилых пациентов: клиника, диагностика, лечение. В кн.: Гериатрическая гематология. Заболевания системы крови в старших возрастных группах. Под ред. Л.Д. Гриншпун, А.В. Пивника. М., 2012. [Julhakyany U.L., Grinshpun L.D. Splenic lymphoma form marginal zone cells (spleen lymphocytoma) in elderly patients: clinical features, diagnosis, treatment. In: Geriatric hematology. Blood diseases in the elderly patients. Eds.: L.D. Grinshpun, A.V. Pivnik. Moscow, 2012. Pp. 237–44. (In Russ.)].
3. Силаев М.А., Карагюлян С.Р., Буланов А.Ю. и др. Спленэктомия при массивной и гигантской сплено-мегалии. Гематология и трансфузиология 2011;56(1):6–10. [Silaev M.A., Karagyulyan S.R., Bulanov A.Yu. et al. Splenectomy in massive and giant splenomegaly. Gematologiya i transfuziologiya = Hematology and Transfusiology 2011;56(1):6–10. (In Russ.)].
4. Джулакян У.Л., Обухова Т.Н., Капланская И.Б. Лимфоцитомы селезенки с перестройкой локуса гена *BCL-6/3q27*. Гематология и трансфузиология 2009;54(3):48–52. [Julhakyany U.L., Obukhova T.N., Kaplanskaya I.B. Splenic marginal zone lymphocytoma with rearrangement of *BCL6/3q27* gene. Gematologiya i transfuziologiya = Hematology and Transfusiology 2009;54(3):48–52. (In Russ.)].
5. Джулакян У.Л. Вирусные гепатиты и лимфома из клеток маргинальной зоны селезенки: подходы к терапии. Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика 2012;6(1):120–3. [Julhakyany U.L. Viral hepatitis and splenic marginal zone lymphoma: approaches to treatment. Klinicheskaya onkogematologia. Fundamental'nye issledovaniya i klinicheskaya praktika = Clinical Hematology Oncology. Basic Research and Clinical Practice 2012;6(1):120–3. (In Russ.)].
6. Джулакян У.Л., Бидерман Б.В., Гемджян Э.Г. и др. Молекулярный анализ генов иммуноглобулина в опухолевых В-клетках при лимфоме селезенки из клеток маргинальной зоны. Терапевтический архив 2015;87(7):58–63. [Julakyany U.L., Biderman B.V., Gemdzian E.G. et al. Molecular analysis of immunoglobulin genes in the tumor B cells in splenic marginal zone lymphoma. Terapevticheskiy arkhiv = Therapeutic Archive 2015;87(7):58–63. (In Russ.)].
7. Dunn G.P., Bruce A.T., Ikeda H. et al. Cancer immunoeediting: from immunosurveillance to tumor escape. Nat Immunol 2002;3(11):991–8. DOI: 10.1038/ni1102-991.
8. Vladimirova R., Popova D., Vikenteva E. et al. Chronic lymphocytic leukemia – microenvironment and B cells. Leuk Updat New Insights 2015. DOI: 10.5772/60761.
9. Якутик И.А., Аль-Ради Л.С., Джулакян У.Л. и др. Мутации в генах *BRAF* и *MAP2K1* при волосатоклеточном лейкозе и селезеночной В-клеточной лимфоме из клеток маргинальной зоны. Онкогематология 2016;11(1):34–6. [Yakutik I.A., Al'-Radi L.S., Julhakyany U.L. et al. *BRAF* and *MAP2K1* mutations in hairy cell leukemia and splenic marginal zone B-cell lymphoma. Oncohematology 2016;11(1):34–6. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1818-8346-2016-11-1-34-36.
10. Hanahan D., Weinberg R.A. The hallmarks of cancer. Cell Press 2000;100:57–70. DOI: 10.1007/BF03091804.
11. Dakappagari N., Ho S.N., Gascoyne R.D. et al. CD80 (B7.1) is expressed on both malignant B cells and nonmalignant stromal cells in non-Hodgkin lymphoma. Cytom Part B Clin Cytom 2012;82(2):112–9. DOI: 10.1002/cyto.b.20631.
12. Chaperot L., Plumas J., Jacob M.C. et al. Functional expression of CD80 and CD86 allows immunogenicity of malignant B cells from non-Hodgkin's lymphomas. Exp Hematol 1999;27(3):479–88. DOI: 10.1016/S0301-472X(98)00059-9.
13. Bogolyubova A.V., Efimov G.A., Drutskaya M.S. et al. Cancer immunotherapy based on the blockade of immune checkpoints. Med Immunol 2015;17(5):395. DOI: 10.15789/1563-0625-2015-5-395-406.
14. Janeway C.A., Travers P., Walport M. et al. Immunobiology: the immune system in health and disease. Immuno Biol 2001;5(5):892. DOI: 10.1111/j.1467-2494.1995.tb00120.x.
15. Ярилин А.А. Основы иммунологии. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. [Yarilin A.A. Fundamentals of Immunology. Moscow: GEOTAR-Media, 2010. (In Russ.)].
16. Traverse-Glehen A., Verney A., Baseggio L. et al. Analysis of BCL-6, CD95, PIM1,

- RHO/TTF and PAX5 mutations in splenic and nodal marginal zone B-cell lymphomas suggests a particular B-cell origin Leukemia. *Leukemia* 2007;21(8):1821. DOI: 10.1038/sj.leu.2404706.
17. Ho L., Davis R.E., Conne B. et al. MALT1 and the API2-MALT1 fusion act between CD40 and IKK and confer NF- κ B-dependent proliferative advantage and resistance against FAS-induced cell death in B cells. *Blood* 2005;105(7):2891–9. DOI: 10.1182/blood-2004-06-2297.
 18. Sharpe A.H., Pauken K.E. The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway. *Nat Rev Immunol* 2018 Mar;18(3):153–67. DOI: 10.1038/nri.2017.108.
 19. Keir M.E., Butte M.J., Freeman G.J. et al. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Ann Rev Immunol* 2008;26:677–704. DOI: 10.1146/annurev.immunol.26.021607.090331.
 20. Freeman G.J., Long A.J., Iwai Y. et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* 2000;192(7):1027–34. DOI: 10.1084/jem.192.7.1027.
 21. Dong H., Zhu G., Tamada K. et al. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med* 1999;5(12):1365–9. DOI: 10.1038/70932.
 22. Armand P. Immune checkpoint blockade in hematologic malignancies. *Blood* 2015;125(22):3393–401. DOI: 10.1182/blood-2015-02-567453.
 23. Upadhyay R., Hammerich L., Peng P. et al. Lymphoma: immune evasion strategies. *Cancers (Basel)* 2015;7(2):736–62. DOI: 10.3390/cancers7020736.
 24. Xia Y., Jeffrey Medeiros L., Young K.H. Signaling pathway and dysregulation of PD1 and its ligands in lymphoid malignancies. *Biochim Biophys Acta* 2016;1865(1):58–71. DOI: 10.1016/j.bbcan.2015.09.002.
 25. Wherry E.J. T cell exhaustion. *Nat Immunol* 2011;12(6):492–9. DOI: 10.1038/ni.2035.
 26. Riches J.C., Davies J.K., McClanahan F. et al. T cells from CLL patients exhibit features of T-cell exhaustion but retain capacity for cytokine production. *Blood* 2013;121(9):1612–21. DOI: 10.1182/blood-2012-09-457531.
 27. Barber D.L., Wherry E.J., Masopust D. et al. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* 2006;439(7077):682–7. DOI: 10.1038/nature04444.
 28. Zenz T. Exhausting T cells in CLL. *Blood* 2013;121(9):1485–6. DOI: 10.1182/blood-2013-01-475939.
 29. Wherry E.J., Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol* 2015;15(8):486–99. DOI: 10.1038/nri3862.
 30. Jiang Y., Li Y., Zhu B. T-cell exhaustion in the tumor microenvironment. *Cell Death Dis* 2015;6(6):e1792. DOI: 10.1038/cddis.2015.162.
 31. Thieblemont C. Improved biological insight and influence on management in indolent lymphoma. Talk 3: Update on nodal and splenic marginal zone lymphoma. *Hematology* 2017;1(1):371–8. DOI: 10.1182/asheducation-2017.1.371.
 32. Wang K., Wei G., Liu D. CD19: a biomarker for B cell development, lymphoma diagnosis and therapy. *Exp Hematol Oncol* 2012;1(1):36. DOI: 10.1186/2162-3619-1-36.
 33. Mills D.M., Stolpa J.C., Cambier J.C. Modulation of MHC class II signal transduction by CD19. *Adv Exp Med Biol* 2007;596:139–48. DOI: 10.1007/0-38746530-8_12.54.
 34. Martin F., Kearney J.F. B-cell subsets and the mature -preimmune repertoire. Marginal zone and B1 B cells as part of a “natural immune memory”. *Immunol Rev* 2000;175(1):70–9. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2000.imr017515.x.
 35. Oliver A.M., Martin F., Kearney J.F. IgM high CD21 high lymphocytes enriched in the splenic marginal zone generate effector cells more rapidly than the bulk of follicular B cells. *J Immunol* 1999;162(12):7198–207. DOI: 10.4049/jimmunol.170.5.2293.
 36. Zuccarino-Catania G.V., Sadanand S., Weisel F.J. et al. CD80 and PD-L2 define functionally distinct memory B cell subsets that are independent of antibody isotype. *Nat Immunol* 2014;15(7):631–7. DOI: 10.1038/ni.2914.
 37. Vincent-Fabert C., Soubeyran I., Saintamand A. et al. Splenic marginal zone B-cell lymphomas depends on programmed death-ligand 1 for clonal emergence and are controlled by T-cells for proliferation rate. *Hematologica*. Abstract PS1377.
 38. Morgan J.A., Yin Y., Borowsky A.D. et al. Breakpoints of the t(11;18)(q21;q21) in mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma lie within or near the previously undescribed gene *MALT1* in chromosome 18. *Cancer Res* 1999;59(24):6205–13.
 39. Dierlamm J., Baens M., Wlodarska I. et al. The apoptosis inhibitor gene *API2* and a novel 18q gene, *MLT*, are recurrently rearranged in the t(11;18)(q21;q21) associated with mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas. *Blood* 1999;93(11):3601–9.

Вклад авторов

Д.С. Бадмажапова: получение данных для анализа, анализ полученных данных, написание текста рукописи;
И.В. Гальцева, Е.Е. Звонков: разработка дизайна исследования, окончательное утверждение статьи;
Ю.О. Давыдова, Н.М. Капранов: анализ полученных данных;
Т.Н. Моисеева, А.М. Ковригина, У.Л. Джулакян, К.И. Данишян, К.Р. Сабилов: получение данных для анализа;
Е.Н. Паровичникова, В.Г. Савченко: окончательное утверждение статьи.

Authors' contributions

D.S. Badmazhapova: obtaining data for analysis, data analysis, article writing;
I.V. Galtseva, E.E. Zvonkov: design development, final approval of the manuscript;
Yu.O. Davydova, N.M. Kapranov: data analysis;
T.N. Moiseeva, A.M. Kovrigina, U.L. Julhakyan, K.I. Danishyan, K.R. Sabirov: obtaining data for analysis;
E.N. Parovichnikova, V.G. Savchenko: final approval of the manuscript.

ORCID авторов / ORCID of authors

Д.С. Бадмажапова / D.S. Badmazhapova: <https://orcid.org/0000-0002-4223-2366>
И.В. Гальцева / I.V. Galtseva: <https://orcid.org/0000-0002-8490-6066>
Е.Е. Звонков / E.E. Zvonkov: <https://orcid.org/0000-0002-2639-7419>
Ю.О. Давыдова / Yu.O. Davydova: <https://orcid.org/0000-0001-5932-0285>
Н.М. Капранов / N.M. Kapranov: <https://orcid.org/0000-0002-6512-910X>
Т.Н. Моисеева / T.N. Moiseeva: <https://orcid.org/0000-0001-9591-8508>
А.М. Ковригина / A.M. Kovrigina: <https://orcid.org/0000-0002-1082-8659>
К.Р. Сабилов / K.R. Sabirov: <https://orcid.org/0000-0003-3677-0480>
Е.Н. Паровичникова / E.N. Parovichnikova: <https://orcid.org/0000-0001-6177-3566>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.
Financing. The study was performed without external funding.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России. Протокол № 136 от 21.11.2018.

Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights and principles of bioethics

The study protocol was approved by the biomedical ethics committee of National Medical Research Center for Hematology, Ministry of Health of Russia. Protocol No. 136 dated 21.11.2018.

All patients gave written informed consent to participate in the study.